

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A Thymic Stromal Lymphopoietin szerepének vizsgálata egészséges
bőrben és immun-mediált bőrgyulladásban**

Dajnoki Zsolt

Témavezető: Prof. Dr. Szegedi Andrea



DEBRECENI EGYETEM

PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGOLÓGIAI

DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2017

A THYMIC STROMAL LYMPHOPOIETIN SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA EGÉSZSÉGES BŐRBEN ÉS IMMUN-MEDIÁLT BŐRGYULLADÁSBAN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dajnoki Zsolt okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai
Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Bata Zsuzsanna, az MTA doktora
Dr. Lányi Árpád, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK,
Belgyógyászati Intézet "C" épület Tárgyalóterme
2016. június. 23., 11:00 óra

Az értekezés bírálói: Dr. Antal-Szalmás Péter, az MTA doktora
Dr. Nagy György, MD, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Bata Zsuzsanna, az MTA doktora
Dr. Antal-Szalmás Péter, az MTA doktora
Dr. Lányi Árpád, PhD
Dr. Nagy György, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Belgyógyászati Intézet "A" épület Tanterme
2017. október 6., 13:00 óra

BEVEZETÉS

Az elmúlt évek legkiemelkedőbb felfedezései közé tartozik, hogy a mikrobiális közösség figyelemre méltó különbségeket mutat a topográfiai eltérő bőrterületeken. Kimutatták, hogy ezeknek a baktériumoknak a kolonizációja a bőrterület fiziológiájától függ, mivel specifikus baktériumok társulnak a nedves, száraz és zsíros bőrterületek mikrokozonyezetéhez, valamint a kémiai milió sokféleségét is leírták, amelyben ezek a mikrobiális közösségek élnek. A mikrobióta nagymértékű sokfélesége nemcsak a bőr barrieren jellemző, hanem a bél különböző szakaszain is ismert, hogy heterogén mikrobióták kolonizálják őket, és ezek az eltérő bélszakaszok különböző anatómiai és fiziológiai jellemzőivel társulnak.

A mikrobióták sokfélesége mellett a közelmúltban végzett vizsgálatok a gazdaszervezet és a mikroorganizmusok közötti kölcsönös kapcsolatot mutattak ki, mivel fontos szerepet játszanak a szöveti homeosztázisban és a lokális immunitásban.

Ezek az eredmények felvetik a lehetőségét annak, hogy az immunaktivitás mértéke eltérhet különböző barrier felszíneken, ahogyan azt a bélben már korábban kimutatták.

Például a thymic stromal lymphopoietint (TSLP), mely az egyik legfontosabb epimmunom molekula (epitheliális sejt eredetű molekulák, amelyek képesek az immunsejteket irányítani), csak bizonyos bélszakaszokban észlelték, amelynek legmagasabb konstitutív expresszióját a vastagbél epitheliális sejtekben (EC) detektálták.

Ez a fehérje a dendritikus sejtek (DC) funkciójának történő modulálása révén a bélben részt vesz a kommenzális mikroflóra toleranciájának kialakulásában.

A TSLP tolerogén szerepét a közelmúltban végzett vizsgálatok is alátámasztják, ahol a Crohn betegségben csökkent TSLP szinteket és megváltozott mikrobiális összetételt tudtak kimutatni. Eddig a bőrben a TSLP-t csak a gyulladásos körülmények között, atópiás dermatitisben (AD) és pikkelysömörben írták le, és egyetlen ismert funkciója a bőrben a T helper (Th) 2 polarizáló DC-k promótálása.

Kutatásunk első részében azt a kérdést tettük fel, hogy vajon a bőr fiziológiai és mikrobiális eltérései a különböző bőrterületeken együtt járnak-e a bőr immunműködésének és TSLP expressziójának topográfiai eltéréseivel. Annak a lehetősége, hogy a bőr immunrendszer “funkcionális hangolása” különböző lehet egyes bőrrégiókban, még nem merült fel az irodalomban.

Kutatásunk második részében, arra kerestük a választ, hogy a TSLP-termelés és az immun-mediált bőrgyulladás más komponensei (KC funkció, T-sejt és DC szám) mutatnak-e eltérést gyakori R501X és 2282del4 filaggrin (FLG) mutáció hordozó és FLG génre nézve

vad típusú AD-ben szenvedő betegek bőrén.

A TSLP T helper (Th) 2 promótáló kapacitása jól ismert az AD bőrben, de eddig az irodalomban nem találhatók olyan adatok, amelyek megkülönböztetik és összehasonlítják a KC-k TSLP termelését és más veleszületett immunfunkcióit, valamint a T sejtek és DC-k számát genetikai vagy szerzett FLG hiányban szenvedő, súlyos AD betegek bőrén.

A TSLP fehérje, annak receptora és regulátorai

A TSLP-t először egy rágsáló thymus stróma sejtvonalból klónozták és azonosították, mint egy B sejtekre ható növekedési faktort. A TSLP humán formájának klónozása után bebizonyosodott, hogy a szekvencia homológiája csak 34% az egér ortológjával. A humán TSLP gén az 5q22.1 kromoszómán helyezkedik el az 5q31 atópiás citokin klaszter mellett. Ez a négy hélixes köteget tartalmazó, rövid láncú hematopoietikus citokin erős szerkezeti és funkcionális homológiát mutat az IL-7-tel, melyek egymással átfedő, de különálló biológiai profillal rendelkeznek.

A közelmúltban végzett vizsgálatok egy második, rövid TSLP izoformát is azonosítottak. A TSLP hosszú izoformája (korábban leírt) 159 aminosavból áll, míg a rövid TSLP-nek megegyezik az aminosav szekvenciája, de az első 96 aminosav hiányzik.

A TSLP biológiai aktivitását az IL-7 receptor α -lánc és a TSLP receptor (TSLPR) által alkotott heterodimer receptorához történő kötődésével fejtik ki. A humán TSLPR önmagában alacsony affinitással köti a TSLP-t, de IL-7Ra-val nagy affinitású komplexet képezve (dimerizáció) aktiválja a TSLP jelátviteli útvonalát. A TSLPR csak néhány sejttípusban expresszálódik, nevezetesen DC-k, monociták és néhány T sejt klón. A két TSLP izoforma funkcióját illetően Fornasa és mtsai. és Bjerkan és mtsai. leírták, hogy a homeosztatikus TSLP rövid izoformája antiinflammatorikus és antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkezik, míg a TSLP rövid izoformája gyulladáskeltő hatással bír. Eddig azonban csak néhány munkacsoport vizsgálta a két TSLP izoformának pontos funkcióját. További kísérletek szükségesek specifikus szerepük tisztázásához mind homeosztatikus, mind gyulladásos kondíciókban.

Az elmúlt években, mivel a TSLP szerepét számos homeosztatikus és patológiás állapotban leírták, a fehérje szerepének pontosabb megértése a kutatások középpontjába került. A TSLP kifejeződését fokozzák a Toll-like receptor (TLR) 3 ligandok, Th2 citokinek, TSLPR vagy IL-7R és még számos más szabályozó molekula befolyásolhatja expresszióját. Az IL-1 β és tumor nekrozis faktor (TNF- α) által aktivált NF- κ B a TSLP génexpressziójának egyik fő pozitív szabályozója, de a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonalon is fokozható expressziója. A kettős szálú RNS és poli(I:C), mint jól ismert TLR3 ligand és

agonista, szintén képes TSLP-t indukálni az NF- κ B, az interferon szabályozó faktor (IRF3) és az aktiváló fehérje (AP) -1 aktiválásának közvetítésével. Az IL-4 és az IL-13 STAT6-függő módon elősegítik a TSLP expressziót. A retinoid X receptor (RXR)- α és/vagy RXR- β dimerek D-vitamin receptor (VDR) vagy retinoinsav receptor- γ korepresszorok jelenlétében hatékonyan gátolhatják a TSLP expresszióját. A glükokortikoidok szintén negatívan szabályozhatják expresszióját, valószínűleg az AP-1 vagy az NF- κ B gátlásával.

A TSLP szerepe a thymusban

Az EC-k korpuszkuláris testeit, más néven a Hassall testeket, amelyek a thymus medullájának belsejében helyezkednek el, először 1849-ben írta le Arthur Hill Hassall. Ezek a struktúrák jól fejlettek az emberi thymusban és "a halott thymocyta temetőjét" reprezentálják, emellett privilegizált terület a medulláris thymocyta érleléséhez. A Hassall testekre aktív citokinek és növekedési faktor receptorok által közvetített sejtszignaling és sejtanyagcsere jellemző, többek között TGF- α -t, IL-7, strómális eredetű faktor 1, CD30 ligand és makrofág eredetű kemokinek (MDC) tartoznak a szekretált anyagok közé. Ezek arra utalnak, hogy a thymus és az antigén-prezentáló sejtek, valamint a fejlődő T-sejtek között aktív kommunikáció áll fenn. Ezen kívül a human thymus EC-k expresszálják a TSLP-t a medullában.

A TSLP által aktivált DC-k kulcsfontosságú szerepet játszanak a regulatórikus T-sejtek (Treg) differenciálódásában és indukálják a homeosztatisz naiv T sejtek proliferációját, melyet a proinflammatorikus citokinek gátolnak. A CD4+CD25+ thymocyta lokalizációja a thymus medullájára van korlátozva, és szoros kapcsolatban állnak az aktivált DC-LAMP+CD86+ DC-kkel és a Hassall testekkel. Ezek a megállapítások azt sugallják, hogy a Treg sejtek a thymus medullában alakulnak ki a TSLP által aktivált DC-kkel szoros kapcsolatban, mely TSLP-nek a forrása a Hassall testek epitheliális sejtjei.

Számos transzkripció faktor felelős a különböző lymphoid sejtvonalak kialakulásáért, melyek nemcsak a korai stádiumban lévő T sejtek sorsát határozza meg, hanem döntő szerepet játszik a differenciálódás alternatív útvonalainak visszaszorításában. Specifikus példaként az IL-12 és IL-4, a jól ismert Th1 és Th2-promótáló citokinek hozhatóak fel, melyek felülbírálnak a FOXP3 útvonalat, és aktívan gátolhatják a Treg sejtek fejlődését a CD4+ thymocytaiból. Bár egy egyedülálló mikrokörnyezet jellemző a thymusra, annak pontos természeték megismerése még várat magára.

A TSLP szerepe a gyomor-bél traktusban

A thymusszal ellentétben a bélben a TSLP kettős funkcióját írták le. Míg alacsony koncentrációban a TSLP homeosztatikus szerepét mutatták ki, a fiziológias TSLP szinttől nagyobb, illetve kisebb mennyiségben gyulladást keltő képességgel rendelkezik. Az intesztinális EC-k konstitutívan expresszálnak TSLP-t az alsó gasztrointesztinális traktusban és a legmagasabb szintjét a vastagbélben észlelték. A TSLP konstitutív termelését *in vitro* is közölték humán intesztinális EC-kben. Korábbi vizsgálatok azt sugallták, hogy a bél mikrobióta és az intesztinális EC-k bazális TSLP-termelése közötti szoros kölcsönhatás áll fenn, mely elősegítheti a nyálkahártyában a DC-k toleranciáját a kommenzális mikrobiótával szemben. Ezek az intesztinális EC-k által kondicionált DC-k képesek fokozni OX40 ligandjuk expresszióját, elősegítve a T-sejtek nem-gyulladásos Th2-típusú polarizációját, és csökkenteni az IL-12 és az IL-23 heterodimer citokinek által megosztott alegység, a p40 kifejeződését. Az említett DC-k szintén képesek FOXP3⁺ Treg sejteket indukálni. A fenti eredmények támogatják a TSLP kulcsfontosságú szerepét az intesztinális immunhomeosztázis fenntartásában. A TSLP szerepét a bél megbetegedéseiben is leírták. A gyulladásos bélbetegségek (IBD), nevezetesen a Crohn betegség (CD) és az ulcerative colitis (UC), olyan multifaktoriális betegségek, amelyekben abnormális immunválasz alakul ki a bélben lévő kommenzális mikrobiótával szemben. Az UC betegek nyálkahártya elváltozásaiban emelkedett TSLP szintet figyeltek meg és a gyulladásos Th2 citokineket találták felelősnek a magas TSLP expresszióért. Irodalmi adatok bizonyítják, hogy a Th2 típusú gyulladást a TSLP elősegíti, így egy ördögi kör kialakulása állhat az UC pathogenezisének hátterében, a fennálló allergiás állapot eredményeként. Ezzel ellentétben, a CD-ben a vastagbél EC-k a TSLP-t alacsonyabb mennyiségben fejezik ki, mint az egészséges kontrollok, és a CD betegekből származó primer intesztinális EC-k egyáltalán nem termelik. Következésképp, a kommenzálisok által aktivált DC-ben az IL-12 felszabadulása nem gátolható. Ezek hatására egy Th1/Th17 típusú gyulladás jön létre, melyet az IFN- γ és az IL-17 citokinek termelése jellemez. A TSLP fontos szerepet játszik a gyomor-bélrendszer más szerveiben, például a nyelőcsőben is. Eosinophil oesophagitisben (EoE), mely a nyelőcső allergiás betegsége, leírták, hogy az EC-k túlexpresszálják a TSLP mRNS-t és a basophilok nagyszámú beáramlását. Az EoE-ra jellemző Th2 típusú gyulladás TSLP általi promótálását tovább fokozhatja a basophilek hisztamin-, Th2 citokin- és kemokintermelése. A TSLP emellett aktiválja a DC-k érését és funkcióját is, promótálva a Th2 sejtek kialakulását. Ezen kívül a TSLP közvetlenül is befolyásolhatja a T sejtek Th2 citokin szekrécióját.

A TSLP szerepe a légutakban

Ami a TSLP szerepét illeti a légutakban, a szakirodalomban található legtöbb adat gyulladásos jellemzőjéhez kapcsolódik, kevésbé ismertek a homeosztatisztikus körülmények között végzett hatásai. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a TSLP kulcsfontosságú molekula az allergiás légúti gyulladások, például az asztma, az allergiás rhinitis (AR) és az orr polipózis iniciációjában. Habár az egészséges humán hörgő epitheliális és simaizomsejtek, valamint a tüdő fibroblastok kis mennyiségben expresszálják a TSLP-t, az asztmás páciensek légúti epithéliumában mRNS- és fehérjeszintű kifejeződésének fokozódását is kimutatták és szintje korrelált a Th2 citokinek mennyiségével és a betegség súlyosságával. A génszintű asszociációs vizsgálatok (GWAS) kimutatták, hogy a TSLP az asztma kialakulásának erős hajlamosító tényezője. Hasonló eredményeket találtak krónikus obstruktív tüdőbetegségben (COPD) szenvedő egyéneknél, mely azt sugallja, hogy a diszfunkcionális epithelium szerepet játszhat a TSLP kifejeződésének fokozódásában az asztmás betegek tüdejében. Az asthmával és az AD-val együtt az AR az úgynevezett "allergiás triád"-ot alkotja. A GWAS vizsgálatok kimutatták, hogy a TSLP polimorfizmusa asszociációt mutat az AR-rel asthmás betegeknél. A TSLP kulcsfontosságú szerepet játszik az AR pathofiziológiájában is, a betegek orr epithéliumában a TSLP szintje magasabb, mint a kontrollokban, korrelál a betegség súlyosságával és az IL-4 szintjével, valamint asszociációt mutat a Th2 típusú gyulladással a Th2 sejtek promótálása és a Treg sejtek gátlása révén.

Az orr polipózis a felső légutak egy másik gyulladásos betegsége. A nazális polipokban szintén megnövekedett TSLP expresszió mutatható ki és szintje korrelál az IgE mennyiségével és az eozinofilok számával. Emellett a DC-k TSLPR és OX40L kifejeződése is emelkedett expressziót mutat a nazális polipokban.

Feltételezhető, hogy a TSLP az "allergiás triád" tagjaiban hasonló útvonalakon hat. A TSLP hatással van a DC-kre az OX40L expressziójának növelésével és a Th2 kemokinek szekréciójának fokozásával, ami végül a gyulladásos Th2 sejtek és a Th2 citokin termelés elősegítéséhez vezet. Fontos megjegyezni, hogy a TSLP önmagában nem képes iniciálni egy teljes mértékben kifejlődött allergiás légúti betegséget, mivel idegen antigének és CD4+ T sejtek jelenléte is szükséges. A TSLP a légutakban valószínűleg egy nagyon jelentős hajlamosító tényező a kóros Th2 válaszok allergiában való elősegítésére.

A TSLP szerepe a bőrön

Bár a TSLP mRNS kifejeződését már detektálták egészséges bőrben, annak fehérje expresszióját és pontos szerepét csak az AD és psoriasisos betegek gyulladt epidermiszében és Netherton-szindrómában, egy súlyos genetikai hátterű bőrbetegségben ismert eddig. A vizsgálatunkig nem álltak rendelkezésre adatok a TSLP lehetséges homeosztatikus szerepéről a bőrben.

Netherton-szindróma

A Netherton-szindróma egy autoszómális recesszív bőrbetegség, melyet a SPINK5 gén funkcióvesztéssel járó mutációja okoz, és az által kódolt LEKTI szerin proteáz inhibitor fehérje hiánya következtében állandó atópiás manifesztációval jellemezhető. A LEKTI hiánya a szerin proteázok állandó aktiválódását okozza. Ennek hatására a kallikrein (KLK) 5 közvetlenül aktiválja a proteáz aktivált receptor-2 (PAR2) fehérjét, mely a TSLP génexpresszió fokozódásához és a KC-k TSLP termeléséhez vezet. A PAR2-vel párhuzamosan a KLK7 és neutrophil elasztáz (ELA2) is aktiválódik a KLK5 által, amely elősegíti a diszfunkcionális bőr barrier kialakulását. A barrier kóros változásai következtében a mikrobák és allergének könnyen átjuthatnak, amely az IL-1 β termelődéshez vezet a kaspáz 1 aktiválásán keresztül, tovább fokozva a gyulladást.

Pikkelysömör

Egy közelmúltbeli vizsgálatban a TSLP magas expressziós szintjét találták pikkelysömörben szenvedő betegek epidermiszében. Ezek az eredmények váratlanok voltak, mivel korábban a TSLP szerepét csak a Th2 betegségek pathogenezisében írták le, azonban psoriasisban, a viszonylag jól ismert, Th1/Th17 karakterisztikát mutató autoimmun betegségben nem. Volpe és mtsai. közölték, hogy a TSLP és az OX40 ligandok szinergisztikusan képesek indukálni a DC-k IL-23 termelését. A szerzők továbbá azt találták, hogy az IL-4, egy Th2-promótáló citokin, STAT6-független útvonalon gátolta azon DC-k IL-23 termelődését, melyeket előtte TSLP-vel és OX40 liganddal együtt kezeltek. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a TSLP a gyulladás típusától függően különböző módon működhet és a psoriasis kezelésében felmerülhet potenciális terápiás targetként.

Atópiás dermatitis

Az AD egy krónikus gyulladós bőrbetegség, mely gyakran társul más allergiás betegségekkel és súlyos életminőség romlást okoz. Genetikai és környezeti tényezők közötti

kölcsönhatások közösen járulnak hozzá kialakulásához. A túl reaktív szerzett és a szabályozatlanul működő veleszületett immunválaszok, illetve a kórosan megváltozott bőr barrier funkciók együttesen vezetnek a betegség kialakulásához. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az AD egy alapvetően Th2-mediált betegség, melynek krónikus fázisban a Th1 és Th22 sejtek egyidejű jelenléte is megfigyelhető. A megváltozott adaptív immunfunkciók mellett számos kutatás célozta a rendellenes veleszületett immun- és bőr barrier mechanizmusokat is. Egyre több bizonyíték támasztja alá azt a hipotézist, hogy a KC-k fokozhatják a gyulladásos válaszokat AD-ben citokinek és kemokinek (pl. TSLP, IL-33 és CCL27) egyedi kompozíciójának termelése révén. Az AD bőrben a TSLP-t a KC-k termelik, és ismert, hogy képesek CD11c+ myeloid DC-ket indukálni és ezáltal gyulladásos Th2 választ elősegíteni. Korábbi vizsgálatok szignifikánsan emelkedett szérumban, epidermális és stratum corneum TSLP szinteket mutattak ki AD-ben a kontrollokhöz képest. Expressziója a stratum corneumban korrelál a betegség klinikai súlyossággal. Az elmúlt évtizedben a KC-k bőr barrier zavarokban játszott szerepe előtérbe került. Az FLG egy fontos bőr barrier struktúrfehérje, melyről korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a gyakori (R501X és 2282del4), valamint a ritka (S3247X, R2447X és 3702delG) FLG null mutációk fontos hajlamosító faktorok az AD előidőzésében. Másrészt számos korábbi vizsgálat azt jelezte, hogy a gyulladásos citokin- és kemokin-milió hasonlóan károsíthatja a bőr barrier súlyos AD-ben, mely szerzett FLG-veszteshez vezet, azáltal, hogy csökken az FLG és profilaggrin feldolgozó enzimek génexpressziója. Eddig nem merült fel a kérdés, hogy a genetikai vagy a szerzett bőr barrier károsodás esetén eltér-e a KC-k immunfunkciója.

A TSLP lehetséges szerepe az egészséges bőrben és papulopustulosus rosaceában

Bőrünk hatékony védelmet biztosít a kórokozók és a fizikai-kémiai behatások ellen, másrészt tolerálja az ártalmatlan környezeti faktorok és a kommenzális mikrobiomot. A bőr barriernek három különböző rétegét írták le: a fizikai, a kémiai/biokémiai (antimikrobiális, veleszületett immunitás) és az immunológiai barrier. A fizikai barrier elsősorban a stratum corneumból áll, de a nukleált epidermisz, a sejt-sejt kapcsolatok és az asszociálódó citoszkeletális fehérjék is hozzájárulnak ehhez a funkcióhoz. A kémiai/biokémiai barrier lipidek, hidrolitikus enzimek, antimikrobiális peptidek alkotják. Az immunológiai gát az immunrendszer humorális és celluláris összetevőiből épül fel, mind az epidermiszben, mind a dermiszben.

A bőrfelület ultrastruktúrájának szerves részeit képezik a verejtékmirigyek, a szőrtüszők és a faggyúmirigyek. Ezek a függelékek mélyen behatolnak a dermiszbe ezáltal, mintegy csatornát képezve, külső anyagok elérhetik a mélyebb rétegeket.

Az eccrin verejtékmirigyek szinte az egész bőrfelületen egyenletesen oszlanak el és hozzájárulnak a hűvös, száraz és enyhén savas környezet fenntartásához. Ezenkívül antimikrobiális peptideket termelnek, amelyek korlátozzák a mikrobák kompozícióját. Apokrin verejtékmirigyek elsősorban olyan helyeken találhatók meg a bőrfelületen, mint az axilla, genitális és perianális területek, és működésüket pubertáskor kezdik el.

A faggyúmirigyek elsősorban a bőr szőrös területein találhatóak, és a szőrtüszőkhöz kapcsolódnak, pilosebaceous egységet alkotva. A faggyú szekrécióját biztosítják, mely egy zsírban gazdag anyag és anoxikus, lipidgazdag környezetet teremt a hajon és a bőr felületén. A faggyú lebomlásával szabad zsírsavak keletkeznek, melyek a sebocytából származó cathelicidinnel, defenzinokkal és antimikrobiális hisztonokkal együtt a mikroorganizmusok kolonizációját szabályozzák.

Az apokrin verejtékmirigyek és faggyúmirigyek sűrűsége alapján háromféle bőrterületet különböztetünk meg: zsíros, nedves és száraz területek. A nedves területek, mint az axilla, sűrű hajnövekedést támogathatnak, a zsíros területek több faggyút termelnek, mint például az arc és a hát. A legszárazabb helyek közé tartozik az alkar és a kézfej. A bőr mikrobiális közössége figyelemre méltó különbségeket mutat a zsíros, száraz és nedves területeken, valószínűleg a régiók különböző fiziológiájához kapcsolódva.

Mivel a bőr mikrobiótája kölcsönösen kapcsolatot mutat a bőr immunrendszerével, feltételezhetőek a topográfiailag különböző egészséges bőrterületek lehetséges immunológiai eltérései, hasonlóan a bélhez, ahol a mikrobióta fontos szerepet játszik a szöveti homeosztázisban és a helyi immunitásban. A szakirodalmi adatok szerint az egészséges bőrben kimutatható TSLP mRNS expressziós van, azonban a fehérje kifejeződését és pontos szerepét még nem vizsgálták részletesen.

A fenti vizsgálatok eredményei alapján azt a kérdést tettük fel, hogy a topográfiai szempontból különböző bőrfelületek vajon eltérő immunkarakterisztikával rendelkeznek-e. A kérdéseink megválaszolásához egészséges, faggyúmirigy gazdag (SGR) és faggyúmirigyben szegény (SGP) bőrterületek és e két bőrterületre kizárólagosan lokalizálódó két gyulladásos bőrbetegség (AD és Papulopustular rosacea [PPR]) immunmilióját hasonlítottuk össze.

A PPR egy Th1/Th17-mediált gyulladásos bőrbetegség, amely kizárólag az SGR bőrterületekre lokalizálódik. A PPR bőrben a TLR2 és a NALP3 upregulációját, megnövekedett proteáz aktivitást és LL-37 mRNS- és protein expressziót bármilyen fertőző

vagy veszélyes trigger jelenléte nélkül. Az irodalom szerint, bár a jól ismert rosacea triggererek normál körülmények között nem aktiválják a TLR-eket vagy NLR-eket, a csökkent tolerancia magyarázhatja a megnövekedett érzékenységet a bőrnek és a rosaceával kapcsolatba hozható, egyébként ártalmatlan ágensek által kiváltott gyulladásos folyamatok elindítását. A vizsgálatunkig a TSLP lehetséges szerepére a PPR pathogenezisének hátterében nem derült fény.

A TSLP egyéb ismert szerepei

A TSLP kifejeződését leírták krónikus allergiás keratoconjunctivitisben szenvedő betegeknél a conjunctivális EC-kben, szaruhártya EC-kben és a corneoscleralis szövetekben. A TSLP kimutatható az emberi anyatejben is. Szerepe és lehetséges hozzájárulása a gyomorbél traktus allergiás kondícióinak kialakulásához a magzatban jelenleg nem ismert. Egy nemrégiben leírt tanulmány kimutatta a TSLP lehetséges szerepét az anya és magzat közti toleranciában is. Egyre több publikáció veti fel a TSLP autoimmun betegségekben játszott jelentőségét, de pontos szerepe a pathofiziológiájukban még nem tisztázott. Jelenleg a rheumatoid arthritis az egyetlen autoimmun betegség, ahol a TSLP közvetlen szerepe bizonyított. A betegek szinoviális folyadékában és fibroblastjaiban fokozott TSLP és TNF- α termelést írtak le. A fent említett homeosztatisztikus és gyulladásos kondíciókban bizonyított funkciója mellett a TSLP kulcsszereplő a különböző fertőzésekre adott válaszokban is. A *Trichuris* fonálféreggel való fertőzésnek kitett nagy intesztinális EC-k igen gyorsan fokozzák TSLP mRNS-expressziójukat, azt sugallva, hogy a kommenzális mikrobióta összetétel változása érzékelhető a gyomorbél traktusban az EC-k által. *Salmonella typhimurium* fertőzésre adott válaszként az EC-k nagy mennyiségű TSLP-t termelnek, de a kísérletekben a TSLP csak egy szűk koncentráció tartomány volt képes gátolni az IL-12-felszabadulást és elősegíteni a nem gyulladásos Th2 immunválaszt. A *Helicobacter pylori*-val fertőzött follikuláris gastritisben a TSLP fehérje termelését a nyálkahártya léziókban írtak le. Szintén kimutatták, hogy a KC-k és a légúti EC-k vírusfertőzésekre reagálva fokozzák TSLP expressziójukat, de a TSLP pontos szerepe eddig nem ismert. A TSLP-nek a tumorok kialakulásában nyújtott szerepe szintén a közelmúltban közölték. A TSLP erősen kifejeződik különböző tumoros megbetegedésekben és melanóma, valamint mellrák sejtvonalakban. A TSLP ezen tumorokban intratumorális Th2 polarizációt promótál, mely a tumorok növekedéshez vezet. A hasnyálmirigy tumorokat szintén összefüggésbe hozták a TSLP-vel, az emlőrákhoz hasonlóan, jelentős Th2 infiltrációt írtak le. Daganat-asszociált fibroblastok TNF- α és IL-1 β jelenlétében képesek TSLP-t szekretálni, ami a DC-ken fokozza a TSLPR

kifejeződését, lehetővé téve nekik a Th2-polarizáló képesség elérését. Bőr T sejt lymphomákban szenvedő betegek szérumában szintén emelkedett mennyiségű TSLP szinteket detektáltak. A Treg sejtek emellett emelkedett számban voltak jelen a tumorokban és a beteg perifériás vérében, mely megmagyarázhatja, hogy a tumorsejtek hogyan tudják kikerülni a gazdaszervezet immunrendszerét. Tüdőtumorok szövetében a TSLP expressziója korrelált a Treg sejtek számával.

CÉLKITŰZÉS

Jól ismert, hogy a TSLP kiemelkedő fontosságú szereppel bír mind homeosztatikus, mind gyulladásos kondíciókban bizonyos szervekben, azonban a bőrben csak gyulladásos funkcióját írták le részletesen. A kérdés, hogy a TSLP, illetve az immunaktiváció egyéb komponensei különböznek-e topográfiailag eltérő egészséges bőrterületeken, mely magyarázhatná bizonyos gyulladásos bőrbetegségek, mint az AD és a PPR, karakterisztikus lokalizációját, eddig nem merült fel.

Célunk volt:

- a faggyúmirigyben szegény (SGP) és faggyúmirigyben gazdag (SGR) egészséges bőrrégiók immunmiliójének összehasonlítása, a TSLP mennyiségének, az immunsejtek számának, a citokinmiliónek, illetve a transzkripciós faktoroknak a vizsgálatával.
- SGR-specifikus faktorok, mint a kitin és a szébum komponensek, TSLP expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata.
- annak detektálása, hogy az SGP, illetve SGR bőrre jellemző speciális immunmilió milyen módon változik meg olyan bőrbetegségekben, melyek kizárólag SGP vagy SGR bőrrégiókra lokalizálódik (AD és PPR).
- annak meghatározása, hogy az immun-mediált bőrgyulladás (TSLP szint, más KC funkciók és immunsejtek száma) mutat-e különbségeket súlyos tünetekkel rendelkező, genetikai, illetve szerzett filaggrin hiányban szenvedő AD betegek bőrében.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Betegek és egészséges kontrollok

Bőr punch biopsziákat (0.5-1 cm²) beteg és egészséges egyének bőréből nyertünk. Minden bevont egyén aláírta a Helsinki Deklaráció nyilatkozatának megfelelő, írásos beleegyező nyilatkozatot. Kísérleteink a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével lettek elvégezve. Minden nyert biopsziát két részre vágtuk. Egyik felület, immunhisztokémiai (IHC) festésekhez, formalin-fixáltuk és paraffinba ágyasztuk; másik felület kvantitatív real-time PCR analízishez -70°C-on RNA Later-ben (Qiagen, Hilden, Németország) tároltuk RNS izolálásig. Kísérleteink első részében 18 egészséges kontroll (8 SGP területről és 10 SGR területről), 8 AD és 10 PPR beteg bőréből (érintett területekről) nyertünk biopsziát. Kísérleteink második részében súlyos, extrinsic típusú AD-ban (magas szérum totál és allergén-specifikus IgE szintek és pozitív Prick teszt) szenvedő betegek és egészséges kontrollok voltak bevonva. Az AD betegeknek nem volt más bőrbetegsége a vizsgálatkor és nem használt egy napja hidratálót, 3 napja helyi kortikoszteroidot és 28 napja szisztémás immunszuppresszánt. Az AD súlyosságának detektálása OSCORAD-dal, illetve a biopsziákból meghatározott epidermisz vastagsággal (ET) és Ki67 expresszióval történt. A FLG genotípusuk alapján két csoportot képeztünk: súlyos tünetekkel rendelkező betegek FLG mutációval (n=12 [2282del4, R501X]) és súlyos tünetekkel rendelkező betegek FLG mutáció nélkül (Wt, n = 12). Mind a 24 betegről biopsziát nyertünk

Immunhisztokémia, haematoxylin és eosin és May–Grünwald–Giemsa festések

Az IHC analízishez a paraffinba ágyazott mintákat tartalmazó metszeteket deparaffináltuk. Hőindukált antigén feltárás után a mintákat 10 percig H₂O₂-dal előkezeltük. A minták festéséhez a következő anti-humán primer antitesteket (Ab) használtuk.: TSLP (Ab 1, Abcam; Ab 2 and 3, R&D Systems), CD3 (Bioss), CD4 (Abcam), CD11c (Abcam), CD1a (Abcam), CD163 (Enzo), CD83 (Abcam), TARC (R&D Systems), IL-10 (Covalab), IL-13 (Bioss), IL17A (Covalab), IFN- γ (Covalab), FLG (Abcam), Ki67 (Sigma-Aldrich), IL-33 (Abcam) és CCL27 (Sigma-Aldrich). Ezt követően a következő HRP-konjugált másodlagos antitesteket alkalmaztuk: anti-mouse/rabbit (Dako), anti-sheep és anti-goat (R&D Systems). Az antitestekkel történő inkubálások előtt és után 3 alkalommal, 5 percig mostuk a mintákat. Az alkalmazott szubsztrátok: Vector VIP Kit (VECTOR Laboratories) vagy 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (Dako) voltak. Végül a metszeteket metilzölddel vagy haematoxylinnal háttérfestettük, dehidráltuk, majd fedőlemezzel fedtük. A bőrmintákon a haematoxylin és eosin (H&E) és a May–Grünwald–Giemsa (MGG) rutin festéseket is

elvégeztük.

Whole-slide imaging

A metszetek digitalizálásához egy Zeiss sima-apokromatikus objektívvel és egy Hitachi 3CCD progresszív scan color kamerával rendelkező Panoramic SCAN digitális metszet szkennert használtunk. Az immunfestések kiértékelését a Panoramic Viewer 1.15.2 szoftver (3DHitech) HistoQuant és NuclearQuant applikációival végeztük. A vizsgálni kívánt területeket (Regions of interest (ROI)) (n=20/slide) kiválasztottuk, majd az összterületet (Field area [FA (mm²)] és a maszkolt területet (Mask area [MA (mm²)] mérté a szoftver. Az FA mutatja a ROI-k összterületét és az MA reprezentálja a pozitív területet. Az MA/FA értékeket minden ROI-ra kiszámoltuk. Az epidermisz vastagságot az AD mintákban a egyes FA-k és a hozzájuk tartozó epidermisz hosszának hányadosainak átlagaként számoltuk. Az egyes fehérjék mennyisége két független vizsgáló által a Panoramic Viewer szoftver segítségével lett megállapítva.

Stratum corneum minták és TSLP immuncitokémia

A stratum corneum mintákat tape-stripping technikával gyűjtöttük. Az analízisig a mintákat -20°C-on tároltuk. A mintákat tartalmazó ragasztószalagokat szilanizált tárgylemezre (Sigma-Aldrich) ragasztottuk, majd egy éjszakán keresztül n-hexánban (Sigma-Aldrich) inkubáltuk. Másnap a mintákat jéghideg acetonban 10 percig fixáltuk, majd 1.0% bovine szérum albuminnal blokkoltuk. PBS-sel történő mosás után a mintákat egy éjszakán keresztül 4°C-on anti-humán TSLP antitesttel (Ab 1) inkubáltuk. Másodlagos antitestként Alexa-Fluor®-488-konjugált anti-rabbit IgG-t (Life Technologies) alkalmaztunk 2 óras inkubálással, szobahőmérsékleten, fénytől védve. A fedést követően a mintákat fluoreszcens mikroszkóppal figyeltük meg. A fluoreszcens képek elkészítését követően a TSLP mennyiségét a fluoreszcens intenzitás és a terület hányadosaként határoztuk meg.

Kísérletek sejtkultúrákon

A HaCaT KC-kat 12-well plétben, 50 000 sejt/well számban tenyésztettük DMEM-ben, míg el nem érték a 80% konfluenciát, majd RT-PCR és citokin ELISA módszerekhez használtuk. A sejtek kezelése 6 vagy 24 órán keresztül történt a következő anyagokkal: Sebomed SZ95 felülúszóval vagy nélküle, kitin, szabad zsírsavak (FFAs) (szkvalén, palmitinsav, sztearinsav, olajsav és linolsav. Az NHEK sejteket a HaCaT-okhoz hasonlóan tenyésztettük EpiLife® médiumban, míg el nem érték a prekonfluens (70-80%), illetve a posztkonfluens állapotot, majd RT-PCR és citokin ELISA módszerekhez használtuk. A sejteket a már említett 6 vagy 24 órás kezeléseknél tettük ki. A humán SZ95 sebocytákat

80%-os konfluencia eléréséig Sebomed médiumban tenyésztettük. A felülszók begyűjtése és 0,2 µm-es filteren történő átszűrése előtt a sejteket EGF nélküli médiumban tartottuk 24 órán keresztül.

Enzyme-linked immunosorbent assay

A felülszókban található TSLP koncentrációk meghatározása triplikátumokban anti-humán TSLP Quantikine® ELISA (R&D Systems) segítségével történt.

RNS izolálás és cDNS szintézis

A minták Tri reagensben (Sigma-Aldrich) Tissue Lyser (Qiagen) segítségével elvégzett homogenizálása után totál RNS-t izoláltunk a bőrmintákból, illetve a HaCaT és NHEK sejtekből, majd DNase I (Applied Biosystems) kezelést végeztünk a gyártó előírása szerint. Az RNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop spektrofotométer (Thermo Scientific) és Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies) használatával állapítottuk meg. Az RT-PCR-hoz, a cDNS szintézise az izolált RNS-ből a High Capacity cDNA Archive Kit (Life Technologies) alkalmazásával történt.

Kvantitatív real-time PCR

Az RT-PCR analíziseket triplikátumokban előre tervezett MGB assay-k (mind az Applied Biosystems-től) segítségével végeztük. A TaqMan génexpressziós assay-eket használtunk a PPIA, totál TSLP, CD80, CD83, CD86, LAMP3, IL-13, IL-10, IL-17, IFN-γ, TBX21, GATA3, RORC, FOXP3, CCR4, CCR8, IL-33 és CCL27 mRNA szintek detektálásához (mind a ThermoFisher-től). A méréseket egy ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System nevű rendszerrel végeztük. A relatív mRNA szinteket a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszerrel normalizáltuk a PPIA expressziójára.

Filaggrin genotipizálás

Az R501X és 2282del4 FLG mutációk analízisét végeztük el AD betegekben. A vérük mononukleáris sejtjeiből GenElute Blood Genomic DNA Kit-tel (Sigma-Aldrich) DNS-t izoláltunk, majd azt PCR amplifikációnak vetettük alá, hogy genotipizáljuk a két mutációt. A PCR termékeket QIAquick PCR purification Kit (Qiagen) segítségével megtisztítottuk, majd a bidirekcionális szekvenálás egy ABI Prism 3100 automata szekvenátorral történt.

A transzepidermális vízvesztés és pH mérése

A méréseket standardizált laboratóriumi körülmények között végeztük 22–25°C-on és 40–60%-os páratartalom mellett. A bevont egyének 5 percig alkalmazkodhattak a körülményekhez a mérés előtt. A transzepidermális vízvesztést (TEWL) célzó méréseket

(g/hm²) a Tewameter TM300 (Courage and Khazaka) eszközzel az egészséges egyének alkarjának hajlító felszínén és arcán végeztük (n=50). A mérések triplikátumokban történtek és egy mérés 30 s-ig tartott. A bőr pH-jának detektálásához pH 905 (Courage and Khazaka) eszközt alkalmaztunk az említett területeken (n=50).

Statisztikai analízis

A statisztikai analízist GraphPad Prism 5 szoftverrel végeztük (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Az egyes csoportok közötti különbségek meghatározásához ANOVA (one-way analysis of variance) tesztet és Newman-Keuls poszt tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag \pm SEM értékekkel ábrázoltuk. A $P < 0.05$ értékeket vettük statisztikailag szignifikánsnak (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). A korrelációs analízisek esetében Pearson r tesztet használtunk. Két csoport összehasonlítása esetén a two-tailed $P < 0.05$ értékeket vettük statisztikailag szignifikánsnak (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

EREDMÉNYEK

A TSLP fehérje konstitutívan kifejeződik az egészséges SGR bőrterületeken, de szinte teljesen hiányzik az egészséges SGP régiókból

A TSLP fehérje topográfiaailag különböző bőrterületeken történő kimutatásához faggyúmirigyben szegény (SGP, száraz területeket reprezentáló) és a faggyúmirigyben gazdag (SGR, seborrheikus területeket reprezentáló) egészséges bőrmintákat használtunk. A súlyos AD mintákban a TSLP detektálását, mint pozitív kontroll végeztük el. Az immunhisztokémiai (IHC) festés megerősítésére három különböző antitestet (Ab) alkalmaztunk a TSLP ellen. Az AD mintákban az epidermisz granuláris és corneális rétegeiben erős TSLP pozitivitást észleltünk, míg az epidermisz bazális és szuprabazális rétegeiben nem volt kimutatható.

Az összes SGR bőrbíopsziában magas TSLP expressziót mutattak az epidermális keratinocyták (KC) mindhárom anti-TSLP Ab-vel való detektálással, főleg a felső epidermális rétegekben és a faggyúmirigyek sebocytáiban. Ezzel szemben az SGP mintákban a TSLP szinte teljesen hiányzott. Fontos megjegyezni, hogy a TSLP festés erőssége (a Pannoramic Viewer szoftver értékelése alapján) szignifikánsan magasabb volt az SGR bőrben az SGP bőrhöz képest.

Azonban a TSLP expressziója SGR bőrben szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az AD bőrben. A TSLP fehérje szintjét a szérumban is mértük immuncitokémiai módszerrel, és szintje szignifikánsan emelkedett volt az SGR bőrben az SGP bőrhöz képest,

de nem éri el az AD bőrben talált szintet. Érdekes módon az RT-PCR analízis kimutatta, hogy közel azonos totál TSLP mRNS expresszió volt minden bőrtípusban (SGR, SGP és AD bőr).

A linolsav TSLP expressziót indukál keratinocytákban

A szébumtartalom, a kommenzális mikrobióták összetétele és az UV sugárzás különböző módon befolyásolhatja az SGR és az SGP bőrrégiókat, ezért ezeknek a tényezőknek a hatását a TSLP termelésre a HaCaT és NHEK sejtekben RT-PCR és ELISA segítségével elemeztük. Mivel hasonló TSLP fehérje szinteket észleltünk a hajas fejbőrön (UV-tól védett) és arc (UV-expozíciónak kitett) biopsziákban, nem vizsgáltuk tovább az UV hatását.

A kitin és a faggyú hatásának tanulmányozására a HaCaT sejteket kitinnel, humán SZ95 sebocyták felülúszójával és a faggyú különböző lipidkomponenseivel kezeltük. A kitin és az SZ95 felülúszó nem tudott szignifikáns TSLP mRNS indukciót kiváltani a kezelése után. A használt lipidkomponensek közül a palmitinsav, olajsav és linolsav fokozta a TSLP génexpresszióját, de csak a linolsav emelte szignifikánsan. Továbbá kimutattuk, hogy a linolsav koncentráció-függő módon indukálja a TSLP mRNS expresszióját, a maximális és szignifikánsan magasabb szintjét elérve 150 μ M-nál.

A bazális TSLP fehérje szinteket azonban a fent említett faktorok egyikével sem tudtuk növelni a sejtekben. Mivel a szébumösszetevők kiemelkedően befolyásolták a TSLP expressziót a HaCaT sejtekben, ezeket a kísérleteket NHEK-ekben is megismételtük, és a HaCaT-oknál kapottakhoz hasonlóan a linolsav dózisfüggően növelte a TSLP mRNS szinteket. Ezzel szemben egyáltalán nem tudtuk detektálni a sejtek fehérje szekrécióját ELISA-val. Korábban az AD bőrben leírták, hogy a barrier károsodása a KC-k TSLP termeléséhez is vezethet, ezért a bőr barrier funkcióit reprezentáló TEWL és pH értékeket is meghatároztuk SGP és SGR bőrterületeken. Mivel e faktorok tekintetében nem találtunk különbséget, úgy gondoljuk, hogy a barrier károsodás nem tehető felelőssé a két region eltérő TSLP kifejeződéséért.

Az SGR bőr emelkedett számú, de alacsony aktivitású DC-kkel jellemezhető az SGP bőrhöz képest

Az SGR bőr szignifikánsan nagyobb TSLP-tartalma azt sugallja, hogy más immunjellegzetességekben is különbségeket mutathat a két egészséges bőrrégió. Mivel a DC-k az elsődleges target sejtjei a TSLP-nek, a CD11c+ dermális myeloid DC-eket és a CD1a+ Langerhans sejteket (LC) immunfestettük és kvantifikáltuk. Az IHC-val nem találtunk szignifikáns különbséget az SGP és SGR területek között az LC számok tekintetében. Ezzel szemben a CD11c+ DC-k szignifikánsan nagyobb számban voltak jelen az SGR területeken és

ezen sejtek többsége a faggyúmirigyek és mirigykivezetők környezetében lokalizálódott. Az AD bőrben az SGR-hez képest nagyobb DC számot detektáltunk és a DC-k diffúzan helyezkedtek el a dermiszben.

Hogy a DC-k jellegzetességeit tovább vizsgáljuk, azok klasszikus érési/aktivációs markereinek, a CD80, a CD83, a CD86 és a DC-LAMP receptorok mRNS kifejeződését is vizsgáltuk. Mivel a TSLP klasszikus proinflammatorikus hatása a Th2-polarizáló DC-k indukálása allergiás betegségekben, vizsgáltuk a TARC [kemokin (C-C motif) ligand 17], egy AD-specifikus, DC-k által termelt kemokin, illetve a CD83 fehérjék kifejeződését IHC-val. Bár a CD83 pozitív sejtek jelenléte és a CD80, CD83, CD86 és LAMP3 génexpressziója nagyobb volt SGR bőrben, mint az SGP-ben, az eltérések nem voltak szignifikánsak. AD-ban szignifikánsan nagyobb CD83+ DC jelenlétet detektáltunk. A TARC egyáltalán nem volt jelen egészséges az bőrregiókban, míg AD-ban nagy mennyiségben kimutatható volt.

Az SGR bőr emelkedett számú T sejtrel és nem gyulladásos IL-10/IL-17 citokin milióval jellemezhető az SGP bőrhöz képest

Következő lépésünk a CD3+ és a CD4+ T sejtek immunfestése volt. Ezen sejtek mennyisége szignifikánsan nagyobb volt az SGR bőrben, mint az SGP-ben. A T sejtek lokalizációja hasonló volt, mint a DC-k esetében, és nagy többségüket, mint Th sejt detektáltuk. Majd az egyes Th alcsoportok jellegzetes citokinjeit [IL-10: regulatórikus T sejt (Treg); IL-13: Th2; IL-17: Th17 és interferon- γ (IFN- γ): Th1] vizsgáltuk IHC-vel. IL-13+ és IFN- γ + sejtek egyáltalán nem voltak jelen a két egészséges bőrregióban. Az IL-10+ és IL-17+ sejtek nagyon alacsony számban vagy egyáltalán nem voltak detektálhatóak SGP bőrben, míg jelentős számú és szignifikánsan több sejt volt jelen az SGR bőrben. Az említett citokinek RT-PCR analízise teljesen hasonló mintázatot mutatott, mint azt fehérjeszinten detektáltuk. Az SGP bőrben a citokintartalom tehát igen alacsony, szemben az SGR bőr jellegzetes IL-17/IL-10 citokin miliójával.

Ezt követően az egyes Th alcsoportok jellegzetes transzkripciós faktorok génexpresszióját hasonlítottuk össze. A T-bet, mely a gyulladásos Th17 [Th17(23)] és a Th1 sejtválaszokat közvetíti és a GATA3, mely a Th2 sejtválaszokat közvetíti, hasonló mRNS szinteket mutatott SGP és SGR bőrben. Ezzel szemben a ROR γ t, mely a nem gyulladásos Th17 [Th17(β)] és a Th17(23) sejtválaszokat közvetíti, és a Treg-ekre jellemző FOXP3 jelentősen magasabb génexpressziót mutatott SGR bőrben az SGP-hez viszonyítva. A CCR4 és CCR8, tipikus Treg homing receptorok, mRNS-ek kifejeződését szintén nagyobbaknak detektáltuk az SGR bőrben.

A makrofágok, neutrophilek, eosinophilek és hízósejtek száma hasonló az SGR és SGP régiókban

Annak megállapítására, hogy a makrofágok, neutrofilek, eozinofilek és hízósejtek száma különbözik-e az SGP és SGR bőrrégiókon, anti-CD163 és May-Grünwald-Giemsa (MGG) festést végeztünk. Az SGR és az SGP bőrfelületek között nem találtunk szignifikáns különbséget a fenti sejtszámokban, bár a CD163 + makrofágok nagyobb mennyiségben voltak jelen SGR bőrben. Sem a neutrophilek, sem az eosinophilek nem voltak detektálhatóak az egészséges bőrterületeken, míg a hízósejteket kis számban megtalálhatóak voltak mindkét régióban.

A papulopustulosus rosacea szignifikánsan csökkent TSLP szinttel, emelkedett DC aktivitással és számmal, robusztus T sejt és veleszületett immunsejt beáramlással és gyulladásos IL-17/IFN- γ citokinprofillal jellemezhető

Hogy megvizsgáljuk az SGR bőr karakterisztikus immunmiliójének megváltozását egy gyulladásos betegségben, mely jellegzetesen ezen a régióon lokalizálódik, papulopustulosus rosaceás (PPR) minták analízisét is elvégeztük. Szignifikánsan kevesebb epidermális és stratum corneum TSLP fehérjeszinteket detektáltunk PPR mintákban az SGR-hez képest. Az IHC képek a TSLP szakaszos eltűnését mutatták a PPR epidermiszben. A TSLP génexpressziós tekintetében nem mutatott különbséget. Az infiltrálódó CD11c+ DC-k, CD3+ és CD4+ T sejtek szignifikánsan nagyobb számban, diffúzan voltak jelen a PPR mintákban, az SGR-hez viszonyítva. A DC-k CD80, CD83, DC-LAMP és CD86 aktivációs/érési markereinek mRNS expressziója szintén szignifikánsan nagyobb volt, mint az SGR bőrben. A szignifikánsan nagyobb CD83+ DC jelenlét mellett TARC pozitivitás gyakorlatilag nem volt detektálható a PPR mintákban. A LC sejtek számában nem detektáltunk különbséget az SGR és PPR minták között. A makrofágok, neutrofilek és hízósejtek jelenléte szignifikánsan nagyobb volt a PPR-ben, míg eosinophilek nem voltak jelen egyik vizsgált bőrben sem.

A PPR bőrminták citokinmiliójének karakterizálását is elvégeztük. A jelentősen megnövekedett számú IL-10+ és IL-17+ sejtek kimutatása mellett egy robusztus IFN- γ jelenlétet is detektáltunk a PPR mintákban az SGR-hez viszonyítva, míg IL-13+ sejtek nem voltak jelen. A citokinek mRNS szintjei megfeleltek azok fehérjeszintjeinek. A TBX21, FOXP3, CCR4 és CCR8 szignifikánsan nagyobb génexpressziót mutatott, míg a RORC és a GATA3 mRNS szintjei alacsonyabbak voltak PPR-ben, mint az SGR-ben.

Mivel a PPR-ben lévő bőrgyulladás fő jellegzetességei a csökkent TSLP szint, az emelkedett DC és T sejt szám, illetve a robusztus IFN- γ jelenlét voltak, ezeket a faktorokat

egymással korreláltattuk és inverz korrelációt találtunk a DC-k száma és a TSLP mennyisége között.

Súlyos, vad típusú és súlyos, FLG mutáns AD betegek súlyossági markereinek detektálása

A két AD csoport összehasonlításához a szövettani súlyossági markerek (ET és Ki67) mennyiségi meghatározását végeztük el, a paraméterek szintjében nem találtunk különbséget a filaggrin mutáns és a vad típusú AD csoport között, azonban a kontrollok ET és a Ki67 expressziós szintjeivel összehasonlítva szignifikánsan magasabb volt mindkét AD csoportban. Ezek az adatok az AD betegek majdnem azonos klinikai súlyosságának feleltek meg.

A KC-k által termelt citokinek, kemokinek és FLG IHC analízise súlyos, vad típusú és súlyos, FLG mutáns AD betegek bőrén

Az FLG-vesztés kimutatására a betegek bőrén a FLG immunfestését végeztük el. Nem volt különbség a FLG szintje között a két betegcsoport bőrén, és a fehérje szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollokéhoz képest. Az AD bőrben az FLG mérsékelten észlelhető volt enyhe pozitivitással, ezzel szemben az FLG folyamatosan, erősen expresszáldott a normál bőr granuláris rétegében.

A KC-eredetű proinflammatorikus citokinek (TSLP, IL-33 és a CCL27 kemokin) mennyiségi meghatározását szintén elvégeztük. Ezeknek a gyulladáskeltő molekuláknak a szintje szignifikánsan magasabb volt az AD betegek bőrén, mint a kontroll csoportban, de a két AD csoport között nem volt különbség. Fontos megjegyezni, hogy a TSLP kis mértékben vagy egyáltalán nem volt észlelhető a kontroll bőrben. Az AD bőrökben erős IL-33 nukleáris pozitivitást figyeltünk meg. Az egészséges bőrben mérsékelten expresszáldott. A két AD csoport hasonló mennyiségben fejezte ki az IL-3-at. A CCL27 egészséges bőrben is kimutatható volt, de szignifikánsan magasabb volt az AD csoportokban. Mindhárom vizsgált paraméter tekintetében nem volt szignifikáns különbség a két AD csoport közötti mRNS szintekben. Az egészséges kontrollcsoport és az AD csoportok összehasonlításával csak az IL-33 mRNS szintekkel kapcsolatban találtunk különbséget.

T sejtek és DC-k vizsgálata súlyos, vad típusú és súlyos, FLG mutáns AD betegek bőrén

A CD3 + T sejteket és a CD11c + DC-ket szintén immunfestettük. A T-sejtek és a DC-k száma szignifikánsan magasabb volt az AD betegek bőrén az egészséges kontrollok bőréhez képest, de nem mutatott különbséget a két AD csoport bőrmintái között.

A szövettani súlyossági markerek és a KC-eredetű citokinek és kemokinek, illetve a T-sejt és a DC számok közötti összefüggések

Mivel a két AD csoport között nem találtunk különbséget a mért paraméterek tekintetében, az AD betegek összes adatait egybegyűjtöttük, és az immunsejtek számát, valamint a KC-eredetű citokinek és kemokinek szintjét korreláltuk az ET, a Ki67 és a FLG tartalom szintjeivel. Statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk a Ki67 és a TSLP szint között, a Ki67 és a CCL27 szint között, az ET és az IL-33 szint között, valamint az ET és a CD3 + sejtek száma között. Korrelációkat nem figyeltünk meg a szövettani súlyossági markerek és a DC számok között, valamint az FLG-szintek és a súlyossági markerek, illetve a T-sejtek és DC számok, valamint az OSCORAD és a vizsgált paraméterek között.

MEGBESZÉLÉS

A bőr mikrobiális közössége figyelemre méltó különbségeket mutat a zsíros, száraz és nedves területeken, valószínűleg ezeknek a helyeknek az eltérő fiziológiájához kapcsolódva. Mivel a bőr mikrobiótája kölcsönösen kapcsolatot mutat a bőr immunrendszerével, feltételezhető a topográfiailag eltérő, egészséges bőrterületek lehetséges immunológiai különbségei feltételezhetőek, de nem feltártak. A bélnyálkahártya immunológiai aktivitásának korábbi vizsgálatai arra utalnak, hogy eltérő bélszakaszokban a TSLP jelenléte eltérő, ezért a vizsgálatunkban elsőként a TSLP-t, a KC-k fontos citokinjét vizsgáltuk. Konstitutív TSLP fehérje expressziót észleltünk egészséges, SGR bőrterületeken; ezzel szemben az egészséges, SGP területeken a TSLP gyakorlatilag nem volt jelen. Bár a TSLP mRNS expresszióját már kimutatták egészséges bőrben, fehérjeszinten csak a gyulladt epidermiszben írták le eddig. A korábbi publikációk és a jelenlegi tanulmány közötti ellentmondásos adatok azzal magyarázhatók, hogy a többi kutatásban valószínűleg egészséges SGP bőrt és nem SGR mintákat alkalmaztak az AD vagy a psoriasis kontrolljaként. Bár a TSLP fehérje expressziója jelentős különbségeket mutatott az egészséges SGP és SGR bőr között, az összes mintában hasonlóak voltak a TSLP mRNS szintek.

A TSLP fehérje és mRNS expressziója közötti eltérés a KC differenciáció során fellépő fontos, de jelenleg ismeretlen poszttranszkripciós módosításokkal magyarázható meg. Bogiatzi és mtsai. bazális TSLP mRNS mutattak ki tenyésztett KC-kban, fehérjeszinten azonban nem tudták detektálni, ráadásul a bazális mRNS expressziót nem tudták fokozni proallergiás citokinek jelenlétében. Másrészt, amikor a KC-k differenciálódását megőrző bőrmoddelt használtak, a TSLP fehérjét is képesek voltak mérni citokin inkubáció után. A poszttranszkripciós módosítások fontossága magyarázhatja a mi megfigyeléseinket is, hogy

bár a linolsav szignifikánsan és dóziszfüggően emelte a TSLP mRNS szintjét, a proteintermelés nem növekedett. Eddig egyetlen tanulmány sem vizsgálta a faggyúkomponensek és az SZ95 sebocyta felülűszó hatását az NHEK vagy HaCaT sejtek TSLP mRNS és fehérje expressziójára, és csak egy kutatócsoport vizsgálta a kitin kezelés hatásait primer és a HaCaT KC-k TSLP fehérje termelésére. Bár az mRNS-szinteket nem vizsgálták, a szerzők koncentrációfüggő módon szignifikánsan emelkedett TSLP fehérje-szinteket észleltek, mely megfigyelést mi nem tudtuk megerősíteni. Mindazonáltal eredményeink szerint a faggyú lipidtartalma szerepet játszhat a TSLP termelés elősegítésében SGR bőrben.

Mivel a DC-k a TSLP hatásának fő target sejtjei, az SGR bőrrégió szignifikánsan magasabb TSLP szintje azt sugallja, hogy más immunfaktorok tekintetében is lehetnek különbségek az SGR és az SGP területek között. Bár az LC számokban nem találtunk különbséget, a SGR bőrben lévő CD11c + DC-k száma szignifikánsan emelkedett az SGP területekhez képest. A nagy számuk ellenére a DC-k nem mutattak figyelemre méltó aktivitást. Ezenkívül a TARC + sejtek teljes hiánya azt jelzi, hogy az SGR bőrben kifejeződő TSLP más módon játszik szerepet, mint ahogy azt az AD bőrben leírják, ahol a TSLP indukálja a Th2 válaszokat elősegítő TARC + DC-eket. Az a tény, hogy a TSLP nemcsak gyulladásos, hanem tolerogén hatással is bír a DC-kre, ismert a bél immunológiai vizsgálataiból. Számos bizonyíték támasztja alá a TSLP kulcsfontosságú szerepét az intesztinális immunhomeosztázis fenntartásában és a kommenzális flórával szembeni toleranciában. Feltételezzük, hogy az SGR bőrben található TSLP hasonló szerepet tölthet be, mivel i) az SGR bőrminták klinikailag egészségesek voltak gyulladásos jelek nélkül; ii) a TSLP mennyisége alacsonyabb volt, mint az AD mintákban; és iii) a DC-k TARC negatívak voltak jelentős aktiválás nélkül.

SGR és az SGP bőrterületek közötti különbségeket a T sejtek száma, a citokinek szintje, valamint a különböző Th altípusra jellemző transzkripciós faktorok tekintetében is találtunk vizsgálatunk során. Szignifikánsan több T sejt volt jelen az SGR bőrben, amely sejtek valószínűleg elsősorban Treg és Th17 (β) sejtek voltak. A Treg sejtek jelenlétét bizonyították a FOXP3 transzkripciós faktor, a CCR4 és a CCR8 Treg homing receptorok magasabb expressziója, és az ezt kísérő szignifikánsan magasabb IL-10+ sejt számok. A legfrissebb adatok szerint a CD4+ sejtek körülbelül 20%-a egészséges humán bőrben expresszálja a FOXP3-at és ezek a Treg-ek olyan effektor memória sejtek, amelyek a szőrtüszőkhöz kapcsolódnak. A szerzők azonban nem hasonlították össze a különböző topográfiájú bőrterületeket. A vizsgálatban kimutatott magasabb Treg tartalmat egy közelmúltbeli klinikai

vizsgálat is alátámasztotta; szolid-szerv tumorokból származó bőrmetasztázisokat leggyakrabban a feji és nyaki területeken találtak és a szerzők a Treg-ek nagyobb számát is felelőssé tették a metasztázisok kialakulásának nagyobb valószínűsége miatt.

A közelmúltban a Th17 sejteket nem patogén Th17 (β) és patogén Th17(23) sejtekre osztották fel. A Th17 (β) sejtekre az IL-17- és IL-10-termelés és a ROR γ t expresszió jellemző, míg a Th17(23) sejtek fontos szerepet játszanak gyulladásos és autoimmun betegségek kialakulásában, IL-17-et, INF- γ -t és GM-CSF-t termelnek és expresszálnak T-bet és ROR γ t transzkripciós faktorokat. Bár jelentősen több IL-17+ és IL-10+ sejt volt jelen az SGR bőrben, az INF- γ + sejtek teljesen hiányoztak, és a magasabb ROR γ t expresszió mellett a T-bet mRNS szintek nem különböztek az SGP bőréhez képest. Ezért feltételezzük, hogy nem patogén Th17(β) sejteket észleltünk az SGR bőrben. A nyugalmi lymphoid sejteket és a $\gamma\delta$ T sejteket szintén figyelembe kell venni, mivel ismert, hogy IL-17-et termelnek. Az SGR bőrrégió nem gyulladásos T sejtjes környezetét az az is alátámasztja, hogy az egészséges bőrterületeken hasonlóan alacsony volt a veleszületett immunsejtek jelenléte is.

Összefoglalva, eredményeink arra utalnak, hogy a bőr mikrobiótához és a kémiai miliőhöz hasonlóan a bőr immunrendszer aktivitásában topográfiai különbség áll fenn egy epidermális faktor (TSLP), a DC-k és T sejtek tekintetében, bár ebben a vizsgálatban nedves bőrterületeket nem vizsgáltunk (elkészítés alatt álló kézirat). Ezek az eredmények ezért magyarázatot adhatnak egyes immun-mediált bőrbetegségek jellegzetes lokalizációjára a speciális topográfiájú bőrterületeken (azaz AD az SGP és PPR az SGR bőrterületeken). Emellett adataink rávilágítanak a helyesen alkalmazott topológiai azonos kontroll bőrminták fontosságára a tudományos vizsgálatokban. Továbbá tanulmányunk befolyásolhatja a jövőbeli barrier korrekciós terápiás megközelítéseit.

Miután felismertük ezt a különleges immunösszetételt az egészséges, SGR bőrnek, megkérdeztük, hogy hogyan változhat ez meg egy immun-mediált bőrbetegségben, mint például a PPR, amely kizárólag az SGR bőrterületekre lokalizálódik. A PPR-ben mind a veleszületett, mind az adaptív immunmechanizmusok speciális aktiválását leírták már korábban a nyilvánvaló fertőző vagy veszélyes trigger hiánya ellenére, és az irodalom azt sugallja, hogy a csökkent tolerancia felelős ennek a fokozott bőrérzékenységnek a kialakulásáért. Eredményeink szerint, egy korábbi kutatáshoz hasonlóan, a PPR bőrben a TSLP szint lecsökken, a DC-k aktiválódnak, a T sejtek gyulladásos típusúvá [Th1 és Th17 (23)] válnak, és számuk rendkívül megnő, mely az SGR bőrre jellemző nem gyulladásos immunmiliőt tönkreteszi. Bár a Treg-ek jelenléte is magasabb volt, ez nem ellentmondás, mivel felhalmozódásukat általában észlelik gyulladásos bőrbetegségekben. Ezeket a

változásokat a makrofágok, neutrofilek és hízósejtek jelentős beáramlása kísérte.

Azt is tudtuk bizonyítani, hogy a linolsav, amely a faggyú fontos komponense, hatással van a TSLP expresszióra, ráadásul az irodalmi adatok szerint PPR betegekben megváltozik a faggyúösszetétel. Ezek alapján megállapítható, hogy a rosaceában kialakult megváltozott faggyútermelés és a tolerogén TSLP elvesztése a PPR fejlődésének egyik fő eseménye lehet. Ez a változás a TSLP szintjében befolyásolhatja a DC-k és a T sejtek aktivitását. Ugyanakkor, mivel a DC-ket potenciálisan közvetlenül a faggyú, a kémiai miliő és a mikrobióták változásainak is ki vannak téve, a nem gyulladásos környezet megváltozása a DC-k vagy T-sejtek oldaláról is elindulhat.

Miután felfedtük az egészséges SGP és SGR bőrregények immunösszetétele közötti különbségeket, és meghatároztuk az SGR bőr specifikus mikrokörnyezetének megváltozását a PPR-ben, megpróbáltuk megvizsgálni, hogy az immun-mediált bőrgyulladás (TSLP és más Th2 jellemző tényezők, DC és T Sejtszám) különbözik-e FLG mutációval rendelkező és vad típusú, súlyos AD betegek bőrében.

Az AD a bőr multifaktoriális immun-mediált gyulladásos betegsége, melyet genetikai és környezeti tényezők kölcsönhatásai vezérelnek. A túl reaktív adaptív, szabályozatlan veleszületett immunválaszok és a károsodott bőr barrier funkciók együttesen vezetnek a betegség kialakulásához. Az FLG, amely a fizikai-kémiai barrier kritikus összetevője, számos genetikai változást mutathat (például a kópiaszám variációk és az FLG null mutációk), és hajlamosító tényező az AD-re. Másrészt szerzett barrier károsodást okozhat a mosószeres gyakori használata, az allergének, a Staphylococcus, csakúgy, mint a lokális bőrgyulladás. Bár a TSLP szerepe jól ismert az AD pathogenezisében, nem merült fel az a kérdés, hogy a genetikai vagy a szerzett bőr barrier zavarai másképp változtatják-e meg a KC-k immunfunkcióját. Vizsgálatunk során célunk volt annak meghatározása, hogy az immun-mediált bőrgyulladás különbözik-e súlyos tünetekkel rendelkező AD betegek bőrében, melyek FLG mutációval vagy szerzett FLG hiánnyal rendelkeznek.

A kérdéseink megválaszolásához két betegcsoportot hoztunk létre: az FLG Wt betegeket és az FLG mutáns betegeket, akik súlyos tüneteket mutattak és hasonló OSCORAD-dal rendelkeztek. Két paramétert, az ET-t és Ki67 expressziót vizsgáltunk a szövettani súlyosság megállapítására. A két AD csoportban szignifikánsan megvastagodott epidermisz és emelkedett Ki67 szinteket találtunk a kontrollhoz képest, míg a két súlyos AD csoport között nem volt különbség. Bár a szérum IgE szintje és a szenzitizáció gyakorisága szignifikánsan magasabb volt az FLG mutáns AD csoportban, a klinikai és hisztológiai súlyosságok azonosak voltak, és az epidermális FLG-tartalomban nem volt különbség. Ezek az

eredmények összhangban vannak korábbi eredményeinkkel, mivel az FLG vesztés szintje a bőrgyulladás súlyosságához kötődik, nem pedig az FLG vesztés okához, míg az IgE szint és az szenzitizáció úgy tűnik, hogy inkább a FLG genotípushoz kapcsolódik.

Annak vizsgálata, hogy a KC-k immunfunkciói különböznek-e az FLG mutációval rendelkező vagy vad típusú, súlyos AD betegek között, a TSLP, IL-33 és CCL27 szöveti szintjeit hasonlítottuk össze. Az utóbbi néhány évben kiemelték a TSLP AD-ban betöltött szerepét. A TSLP ismert a CD11c⁺ myeloid DC-k Th2 irányba történő indukálására való képességéről. A korábbi vizsgálatok szignifikánsan emelkedett szérumszintet, epidermális és stratum corneum TSLP szinteket mutattak az AD-ben a kontrollokhoz képest, míg más munkacsoportok által ezeknél a betegeknél a magasabb szérumszint nem volt kimutatható. Míg a stratum corneum TSLP expressziója és a klinikai súlyosság közötti összefüggést leírták, a szérumszint és az epidermális TSLP szintek és az OSCORAD közötti kapcsolat nagyon ellentmondásos. A korábbi adatokkal párhuzamosan szignifikánsan magasabb epidermális TSLP szinteket találtunk az AD betegek bőrén, mint a kontrollokban. Eredményeink szerint a TSLP fehérje szintje nem különbözött a Wt és az FLG mutáns AD csoportok között. Az epidermális TSLP szintek szignifikánsan korreláltak a Ki67 szintjével, de a TSLP szintek és a klinikai súlyosság között nem volt összefüggés.

Az IL-33, egy újonnan felfedezett AD-specifikus, EC-k által expresszált citokin, mely Th2 lymphocytákat, hízósejteket és eosinophileket aktivál. Eredményeink azt mutatták, hogy az AD csoportokban az IL-33 fehérje expressziója szignifikánsan emelkedett volt a kontrollokhoz képest, de a két AD csoport között nem volt szignifikáns különbség. Ezek az adatok megfelelnek egy korábbi vizsgálatnak, bár ott a FLG mutáns és a Wt AD csoportok összehasonlítását nem végeztek el. Egy másik vizsgálatban korrelációt találtak a szérumszint és az AD súlyossága között. Munkacsoportunk első ízben talált erős korrelációt az ET és az epidermális IL-33 fehérje szintje között, de tudunk kimutatni összefüggést a betegség klinikai súlyossága és az epidermális IL-33 szint között.

A CCL27 egy KC-k által termelt bőrre specifikus kemokin, amely hozzájárul a leukociták beáramlásához és gyulladást okoz a Th2 sejtek bőrbe történő migrációjának elősegítésével. Egy korábbi vizsgálatban az AD betegek lézionális KC-iban erős CCL27 expressziót írtak le. Hasonlóképpen, szignifikánsan emelkedett CCL27 fehérje szinteket tapasztaltunk az AD bőrben, de összehasonlítva a Wt és FLG mutáns AD csoportokat, nem találtunk különbséget. A CCL27 és a Ki67 egymással szignifikánsan korreláló expressziós szintjeit munkacsoportunk ki tudta mutatni, de a szöveti CCL27 szintek és az OSCORAD közötti kapcsolatot nem találtunk.

Az irodalomban nem találtunk RT-PCR adatokat az FLG mutáns és WT AD csoportok összehasonlításával kapcsolatban. Az egészséges kontrollok és AD betegek összehasonlításakor vizsgálatunk során az mRNS szintek nem tükrözték az fehérjék szintjét. Ez a kontraszt a poszttranszkripció módosítással magyarázható, nevezetesen a transláció és mRNS degradáció enzimekkel és mikro RNS-ekkel történő szabályozásával, mely függ a KC-k és a szisztémás igények aktuális állapotától. Eddig csak kevés cikket publikáltak a TSLP és az IL-33 mRNS szintű kifejeződése kapcsán, míg a CCL27 génexpressziójával kapcsolatban nincs adat az irodalomban. A klinikai és szövettani súlyossági markerek és a KC által termelt proinflammatorikus molekulák közötti összefüggésekben tapasztalt különbségek felhívják a figyelmet arra, hogy az OSCORAD alkalmazása nem mindig tükrözi egy adott plakk gyulladásának mértékét; a gyulladás lokális immunsejtjei valószínűleg jobb összefüggést mutatnak a helyi súlyossági markerekkel, mint a teljes bőr súlyosságát jellemző markerrel. Mivel a fent említett citokinek és a KC-k által termelt kemokin hatással van a T-sejtekre és a DC-kre, azok sejtszámát is megvizsgáltuk. Kísérleteinkben, hasonlóan egy korábbi vizsgálathoz, a T sejtek és a DC-k száma szignifikánsan magasabb volt a súlyos AD betegek bőrében, mint az egészséges kontrollokban. Az FLG mutáns és Wt AD betegcsoportok immunsejtjeinek száma között munkacsoportunk nem talált szignifikáns különbségeket. Az ET és a CD3+ T sejtek között erős korrelációt tudtunk kimutatni.

Eredményeinket összefoglalva, kísérleteink azt mutatják, hogy a veleszületett és adaptív immunsejtek száma és a KC-eredetű citokin és kemokin tartalmak által képviselt immunmediált bőrgyulladás nem különbözik a szerzett vagy genetikailag meghatározott FLG vesztéssel jellemezhető súlyos AD betegekben, ami azt jelezheti, hogy KC-kban található FLG mutáció nem befolyásolja eltérően attól a sejtek immunfunkcióját, mintha szerzett módon veszítik el a FLG-t. A korrelációk eredményei azt mutatták, hogy az immunrendszer aktivitása a bőrben sokkal inkább a betegség súlyosságához kötődik, mint a barrier károsodásának eredetéhez.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az egészséges bőr immunaktivitását vizsgálva a thymic stromal lymphopietin (TSLP) termelés, a dendritikus sejt (DCk) és a T sejt számot és funkciót tekintve jelentős topográfiai eltéréseket sikerült kimutatnunk. Konstitutív TSLP fehérje expressziót detektáltunk faggyúmirigyben gazdag (FMG) bőrterületeken; míg a faggyúmirigyben szegény (FMSZ) területeken nem volt kimutatható TSLP jelenlét. A linolsav, egy fontos szébum összetevő képes volt dóziszfüggően növelni a TSLP mRNS expresszióját HaCaT és NHEK sejtekben. Úgy véljük, hogy a FMG bőrben jelen lévő TSLP-nek hasonló szerepe lehet, mint azt kimutatták a bél homeosztázisban, hiszen a vizsgált FMG bőrminták klinikailag egészségesek, gyulladásmentesek voltak; a TSLP mennyisége kisebb volt, mint az AD mintákban; és a DC-k TARC negatívak voltak és alacsony aktivitási státuszt mutattak, valamint a T sejtek sem bírtak gyulladásos jellemzőkkel. FMG bőrben mind a DC-k, mind a T sejtek nagyobb számban voltak jelen. A T sejtek elsősorban regulatórikus T sejtek és valószínűleg nem patogén T helper (Th) 17(β) sejtek voltak. Az FMG bőrben emelkedett mennyiségben detektáltunk IL-17+ és IL-10+ sejteket, míg az IFN- γ + és IL-13+ sejtek teljesen hiányoztak. Eredményeink szerint az FMG bőrterületeket egy nem gyulladásos IL-17/IL-10 citokin milió jellemzi.

Papulopustulosus rosaceában (PPR), mely bőrbetegség kizárólag FMG területeken alakul ki, a TSLP mennyisége csökkent, a DC-k aktiválódtak, a T sejtek gyulladásos típusúvá [Th1 and Th17(23)] váltak, és számuk jelentősen megnőtt.

Szintén kimutattuk, hogy a megjelenő immun-mediált bőrgyulladás (keratinocytá-eredetű faktorok, T sejt és DC szám) filaggrin mutációval rendelkező, illetve vad típusú súlyos AD betegek bőrén azonos; és az AD-ra jellemző immunaktiváció sokkal inkább a betegség súlyosságával áll kapcsolatban, mint a barrier károsodás eredetével. Eredményeink magyarázatot adhatnak arra, hogy bizonyos bőrbetegségek miért mindig adott topográfiai bőrterületre lokalizálódnak (FMSZ bőrön AD, míg FMG bőrön PPR); rámutatathatnak a topológiai megfelelő kontroll bőrminták használatára a tudományos kutatásokban; és végül a jövőben akár terápiás lehetőségekkel is kecsegtethetnek.



Nyilvántartási szám: DEENK/116/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Dajnoki Zsolt

Neptun kód: IWOWO8

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

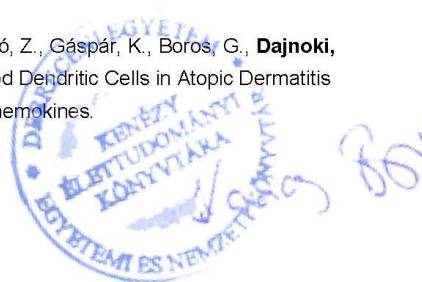
MTMT azonosító: 10054954

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Dajnoki, Z.**, Béke, G., Kapitány, A., Mócsai, G., Gáspár, K., Rühl, R., Hendrik, Z., Juhász, I., Zouboulis, C. C., Bácsi, A., Bíró, T., Törőcsik, D., Szegedi, A.: Sebaceous gland rich skin is characterized by TSLP expression and distinct immune surveillance which is disturbed in rosacea.
J. Invest. Dermatol. 137 (5), 1114-1125, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2016.12.025>
IF: 6.915 (2015)
2. **Dajnoki, Z.**, Béke, G., Mócsai, G., Kapitány, A., Gáspár, K., Hajdu, K., Emri, G., Nagy, B., Kovács, I., Beke, L., Dezső, B., Szegedi, A.: Immune-mediated Skin Inflammation is Similar in Severe Atopic Dermatitis Patients With or Without Filaggrin Mutation.
Acta Derm.-Venereol. 96 (5), 645-650, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-2272>
IF: 3.638 (2015)

További közlemények

3. Kapitány, A., Béke, G., Nagy, G., Doan-Xuan, Q. M., Bacsó, Z., Gáspár, K., Boros, G., **Dajnoki, Z.**, Bíró, T., Rajnavölgyi, É., Szegedi, A.: CD1c+ Blood Dendritic Cells in Atopic Dermatitis are Premature and Can Produce Disease-specific Chemokines.
Acta Derm.-Venereol. 97 (3), 325-331, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-2540>
IF: 3.638 (2015)





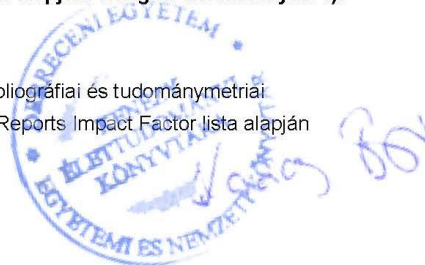
4. Khasawneh, A., Baráth, S., Medgyesi, B., Béke, G., **Dajnoki, Z.**, Gáspár, K., Jenei, A., Pogácsás, L., Pázmándi, K. L., Gaál, J., Bácsi, A., Szegedi, A., Kapitány, A.: Myeloid but not plasmacytoid blood DCs possess Th1 polarizing and Th1/Th17 recruiting capacity in psoriasis.
Immunol. Lett. [Epub ahead of print], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.04.005>
IF: 2.483 (2015)
5. Szegedi, A., **Dajnoki, Z.**: A rosacea pathomechanizmusa.
Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 92 (4), 168-173, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2016.92.4.1>
6. Béke, G., Kapitány, A., **Dajnoki, Z.**, Hajdu, K., Gáspár, K., Bíró, T., Szegedi, A.: A bőr immunrendszerének felépítése és működése.
Immunol. Szle. 7 (2), 4-11, 2015.
7. Mócsai, G., Gáspár, K., **Dajnoki, Z.**, Tóth, B., Gyimesi, E., Bíró, T., Maródi, L., Szegedi, A.: Investigation of Skin Barrier Functions and Allergic Sensitization in Patients with Hyper-IgE Syndrome.
J. Clin. Immunol. 35 (7), 681-688, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-015-0200-2>
IF: 3.094
8. Mócsai, G., **Dajnoki, Z.**, Irinyi, B., Gáspár, K., Szegedi, A.: A bőr barrierkárosodások non-invazív mérési lehetőségei = The non-invasive measurements of skin barrier disruption.
Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 90 (3), 89-93, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2014.90.3.4>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 19,768

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,553

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudásmetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.04.27.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof Dr. Szegedi Andreának, hogy támogatott és motivált az elmúlt öt évben, valamint, hogy idejét nem kímélve, tanácsaival, kedvességgel és lelkesedésével hozzásegített a disszertáció megszületéséhez.

Köszönettel tartozom Bíró Tamás Professzor Úrnak a témában nyújtott konstruktív javaslataiért. Szeretném megköszönni kollégáimnak és barátaimnak, Kapitány Anikónak, Béke Gabriellának, Gáspár Krisztának, Janka Eszter Annának, Boros Gábornak és mindenki másnak, hogy értékes időt, tanácsokat és támogatást adtak nekem. Köszönöm Toka-Farkas Tündének, Kertész Józsefnének és Csapóné Sandra Ildikónak a kiváló technikai segítségüket.

Ebben a nagyon különleges pillanatban szeretném kifejezni legmélyebb köszönetemet a feleségemnek, Vicának a feltétel nélküli szeretetért, bátorításáért és támogatásáért, ami lehetővé tette a tanulmányaim befejezését. Köszönettel tartozom szüleim iránt szeretetükért, türelmükért és bátorításukért az életem minden helyzetében és anyagi támogatásukért.

Munkámat támogatta az OTKA K108421 és az OTKA-PD 112077, a TÁMOP-4.2.2.A-11/1 / KONV-2012-0023- "DEFENSE-NET" projekt (az Új Magyarország által megvalósított) Az Európai Szociális Alap és az Európai Regionális Fejlesztési Alap által társfinanszírozott fejlesztési terv) és a Debreceni Egyetem RH-885/2013. A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00050 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.